

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 2 9 日
Date of Application:

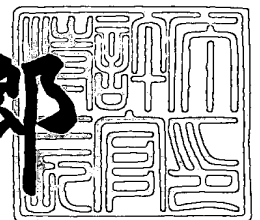
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 1 9 1 8 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 1 9 1 8 7]

出 願 人 シスメックス株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 7 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 5 0 1 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 02-028JP

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

 【氏名】 川手 康德

【特許出願人】

 【識別番号】 390014960

 【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088867

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西野 卓嗣

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 059617

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9723350

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液分析方法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 免疫測定と血球計数測定を同一の測定用試料から行う血液分析方法であって、

血液検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する工程と、測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、

検出された光学的情報に基づき血球を分類して計数し、検出された光学的情報に基づき担体粒子の凝集度を求めて免疫測定対象物質を検出する工程と、からなる、血液分析方法。

【請求項 2】 前記血球計数測定では、赤血球、白血球、血小板を分類して計数することを特徴とする、請求項 1 に記載の血液分析方法。

【請求項 3】 血球の大きさ情報に基づいてヘマトクリット値を求め、該ヘマトクリット値を用いて免疫測定の結果を補正することを特徴とする、請求項 1 に記載の血液分析方法。

【請求項 4】 免疫測定と血球計数測定を同一の測定用試料から行う血液分析装置であって、

血液検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する試料調製部と、

測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する光検出部と、

光検出部が検出した光学的情報に基づき血球を分類して計数し、光検出部が検出した光学的情報に基づき担体粒子の凝集度を求めて免疫測定対象物質を検出する解析部と、からなる血液分析装置。

【請求項 5】 前記解析部は、血球を赤血球、白血球、血小板に分類して計数することを特徴とする、請求項 4 に記載の血液分析装置。

【請求項 6】 前記解析部は、血球の大きさ情報に基づいてヘマトクリット値を求め、該ヘマトクリット値を用いて免疫測定の結果を補正することを特徴と

する、請求項 4 に記載の血液分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血球計数測定や免疫測定といった複数の分野にわたる測定を、一つの試料の反応系・測定系から効率的に行うための血液分析方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

臨床検査の分野においては、血球計数装置、免疫測定装置、凝固測定装置、生化学装置、その他各種分析装置が測定項目に応じて用いられている。そのため複数の分析装置を管理する必要がある。そして各分析装置に応じて患者から検体を採取する必要がある、患者にとっては負担となる。そこで、一つの検体からより多くの項目を測定できる多項目自動分析装置が提供されている。

【0003】

血球計数測定

血球計数測定とは、血液（全血）中に含まれる血球成分を分類し、種類毎の血球数を計数することである。血球は一般的に赤血球、白血球、血小板などに分類され、血球計数の項目としては赤血球数、白血球数、血小板数が代表的である。その他、赤血球として未成熟な状態で末梢血中に出現した網状赤血球などが分類され計数されることもある。

【0004】

血球計数測定を行う分析装置としては、自動血球分析装置XE-2100（シスメックス株式会社製）がある。この装置は、血球を所定の蛍光色素で染色し、各血球から前方散乱光、側方散乱光や蛍光といった光学的情報をフローサイトメトリにより検出し、これらの光学的情報を組み合わせることで血球を分類して計数する機能を有する。この装置のRET測定部は、溶血させることなく、所定の染色液と反応させて蛍光染色を施した血球から、前方散乱光強度と側方蛍光強度を検出し、それらをパラメータとした二次元スキャッタグラムを作成して血球を血小板、赤血

球、網状赤血球などに分類する。血球を蛍光染色するための染色液は、各血球中に含まれる核酸を染色する色素を含んでおり、白血球や網状赤血球が染色される。血球から検出される側方蛍光強度は、血球中の核酸量を反映する情報となり、前方散乱光強度（大きさ情報）と側方蛍光強度（核酸量情報）を組み合わせることにより血球を分類することができる。

【0005】

血球計数測定的项目には、血球数だけではなく、MCVやヘマトクリット値といった項目も用いられる。MCVとは、平均赤血球容積のことであり、全血中の赤血球の大きさの平均値である。ヘマトクリット値とは、全血中に占める血球成分の容積比率である。血球成分容積の大部分は赤血球容積が占めるため、全血中の赤血球数とMCVを求め、MCVに全血中の赤血球数を乗じ、それを全血の体積で除することにより、ヘマトクリット値が算出される。

【0006】

免疫測定

免疫測定とは、血液などの検体中に含まれる抗原又は抗体を測定対象物質とし、それらを抗原抗体反応を利用して検出する測定方法である。代表的なものとして、酵素免疫測定（EIA）法、ラジオイムノアッセイ（RIA）法、粒子凝集法などがある。粒子凝集法は、測定対象物質に対応する抗体又は抗原を感作した担体粒子を試料と混和し、抗原抗体反応による粒子凝集反応を生じさせ、その粒子凝集の度合い（凝集度）を吸光度変化や光散乱変化などから測定し、免疫測定対象物質を検出する方法である。

【0007】

粒子凝集法においては、凝集反応後の担体粒子を含む試料をフローサイトメトリにて測定し、各粒子から得られた光学的情報に基づき凝集度を求める方法が知られている。光学的情報として、担体粒子の大きさを反映する情報、例えば前方散乱光を用いれば、未凝集の担体粒子や凝集した担体粒子の識別ができ、担体粒子の凝集度を求められる。この凝集度としては例えば、特公平6-19349に開示された凝集率がある。これはフローサイトメータで粒子それぞれの散乱光強度を求め、それぞれの散乱光強度によって、未凝集の単独粒子と、複数の担体粒

子が凝集して生じた凝集粒子とを弁別して、単独粒子数(M)と凝集粒子数(P)を計数し、MとPの合計である総粒子数(T)を得、 P/T を凝集率として算出する方法である。この方法では2個の担体粒子が凝集した段階で反応を捉えることができるため、非常に高感度な免疫測定が可能となる。この凝集度測定は免疫測定対象物質の測定濃度範囲に応じて、各種の方法、例えば一定数以上凝集した粒子の割合を測定する方法などを用いることができる。上記公報の凝集度測定方法は、シスメックス株式会社製の免疫凝集測定装置PAMIAシリーズに用いられている。

【0008】

これら血球計数用の分析装置や免疫測定用の分析装置などでは、全血や血清、血漿などを試料とするが、そのうち、血球計数装置では全血試料を用いる必要があり、免疫測定など他の装置では試料として血清又は血漿が用いられることが多いため、分析装置の共通化がなされていなかった。特開平11-101798には血球計数と免疫測定を行うことができる全血血球免疫測定装置が開示されている。この装置は、血球計数測定部と免疫測定部を備え、全血試料を血球計数測定部と免疫測定部にそれぞれ分注して測定する装置である。その免疫測定部では全血試料を溶血剤により溶血させ、ラテックス試薬を用いて免疫測定を行う。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかし血球計数測定と免疫測定の両者を行う場合、患者から採取する検体量を少なくし、一台の小型の分析装置で測定するためには、同一の測定部で血球計数測定と免疫測定を同時に行うことが望まれている。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記の課題に鑑み、本発明は同一の反応系・測定系を用いて血球計数測定と免疫測定を可能にするものである。本発明は、免疫測定と血球計数測定を同一の測定用試料から行う血液分析方法であって、血液検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する工程と、測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する工程と、検出された光学的情報に基づき血球を分類して計数し、検出され

た光学的情報に基づき担体粒子の凝集度を求めて免疫測定対象物質を検出する工程と、からなる血液分析方法を提供する。

【0011】

また本発明は、免疫測定と血球計数測定を同一の測定用試料から行う血液分析装置であって、血液検体に、免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と、血球を染色するための蛍光色素とを混和して、測定用試料を調製する試料調製部と、測定用試料中の粒子から光学的情報を検出する光検出部と、光検出部が検出した光学的情報に基づき血球を分類して計数し、光検出部が検出した光学的情報に基づき担体粒子の凝集度を求めて免疫測定対象物質を検出する解析部と、からなる血液分析装置を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明は、血球計数測定と、粒子凝集法による免疫測定と、を同一試料に対して同時に行うものであり、血球及び担体粒子を含む試料をフローサイトメータにより測定し、前方散乱光や側方蛍光といった各粒子の特徴を反映する光学的情報を検出する。そしてそれらの光学的情報をパラメータとした二次元スキャッタグラム（以下、単に「スキャッタグラム」という）を作成し、スキャッタグラム上に出現した血球及び担体粒子を出現位置に応じて種類毎に分類し、計数する。担体粒子については前記検出した光学的情報に基づき凝集度を求める。

【0013】

図1は本発明を用いた血液分析装置の構成を示す図である。血液分析装置1は、試料調製部11、光検出部12、解析部13、出力部14からなる。

【0014】

試料調製部11は、検体に担体粒子や希釈液、染色液など所定の試薬を添加して反応させ、測定用試料を調製するためのものである。試料調製部11では検体中の血球に蛍光染色が施されるとともに、免疫測定対象物質に対応する抗体又は抗原を感作した担体粒子が添加され、粒子凝集反応を行わせる。担体粒子には、粒子凝集法で一般的に用いられているもの、例えばポリスチレン等のラテックス粒子、磁性粒子、ガラス粒子、デンドリマーなどを用いることができる。担体粒

子に感作する抗原又は抗体には、免疫測定対象物質が抗体であれば該抗体と特異的に抗原抗体反応する抗原が用いられ、免疫測定対象物質が抗原であれば該抗原と特異的に抗原抗体反応する抗体が用いられる。例えば測定項目がCEA抗原（癌胎児性抗原）であれば抗CEA抗体が感作され、測定項目が抗HBs抗体であればHBs抗原が感作される。

【0015】

試料調製部11で調製された測定用試料は、光検出部12へ送液される。光検出部12はフローサイトメータによって構成される。試料調製部11にて調製された測定用試料は、光検出部12のフローセル12aに流されて試料流を形成する。レーザ光源12bからはレーザ光が発せられ、フローセル12aの試料流を照射する。そして試料流中の粒子がレーザ光の照射領域を横切る際に生じる側方蛍光がフォトマルチプライヤチューブ12cに、前方散乱光はフォトダイオード12dによってそれぞれ受光・光電変換されて電気信号となる。

【0016】

光検出部12により検出された側方蛍光・前方散乱光の電気信号は解析部13へ送られる。解析部13はハードディスク、CPU、ROM、RAMなどからなるコンピュータにより構成される。解析部13では、光検出部12によって検出された電気信号を処理し、各粒子の信号毎に側方蛍光強度・前方散乱光強度を得る。そして側方蛍光強度・前方散乱光強度をパラメータとしたスキャッタグラムを作成し、スキャッタグラム上に出現した粒子をその出現位置に応じて各種血球・担体粒子に分類し、計数する。

【0017】

前方散乱光強度は粒子の大きさを反映するものであるので、粒子の種類毎に大きさが異なる場合には前方散乱光強度のみを用いて粒子を分類することができる。血球（血小板・赤血球・白血球）のうち、血小板が最も小さく、白血球が最も大きい。しかしこれらの血球の大きさは明確に分かれるものではなく、異なった種類同士で互いに大きさの重なるものがあるので、前方散乱光強度による大きさ情報だけでは正確に分類することが難しい。そこで、各粒子の大きさ以外の特徴を反映する光学的情報として側方蛍光強度をさらに検出する。血球中に含まれる

核酸を染色する色素により予め蛍光染色を施しておけば、血球から検出される側方蛍光強度は、血球中の核酸量を反映する情報となり、前方散乱光強度（大きさ情報）と側方蛍光強度（核酸量情報）を組み合わせることにより血球をより正確に分類することができる。

【0018】

血球計数測定と免疫測定を同時に行うため、免疫測定に用いる担体粒子は、スキャッタグラム上で血球の出現位置と重なることのないような性質のものをを用いる。例えば担体粒子の大きさを変えることによって前方散乱光強度が調整される。また担体粒子に蛍光色素を含有させたり、含有させる蛍光色素の濃度を変えることにより、側方蛍光強度が調整される。このようにして、担体粒子が二次元スキャッタグラム上で血球と明確に異なる位置に出現するようにすれば、血球と担体粒子の弁別が可能となる。担体粒子として、血球よりも充分小さなもの、あるいは血球よりも充分大きいものを用いれば、前方散乱光強度の違いによって試料中の粒子を担体粒子と血球とに弁別することが可能である。血球と同程度の大きさの担体粒子を用いる場合は、前方散乱光強度と蛍光強度を組み合わせることにより、担体粒子と血球とを弁別することができる。

【0019】

スキャッタグラム上で血球と弁別された担体粒子については、凝集度を求め免疫測定対象物質を検出する。凝集度としては、担体粒子の前方散乱光強度に基づき前記特公平6-19349に開示された凝集率を用いる。担体粒子の凝集率は、既知濃度の免疫測定対象物質を含む検体を測定して予め作成した検量線に基づき、濃度換算される。このようにして、未知検体中に含まれる免疫測定対象物質の濃度が得られる。

【0020】

図2に、本血液分析装置による測定例であるスキャッタグラムを示す。全血検体に、担体粒子として蛍光色素を含有させた蛍光ラテックス粒子と、血球を染色するための所定の蛍光色素とを混合することにより調製された試料から検出した前方散乱光及び側方蛍光に基づき作成されたスキャッタグラムであり、前方散乱光強度を縦軸に、側方蛍光強度を縦軸にとっている。担体粒子は、未凝集の単独

粒子 2 1、二個の担体粒子が凝集して生じた二個凝集粒子 2 2、三個の担体粒子が凝集して生じた三個凝集粒子 2 3 というように、凝集の仕方によって前方散乱光強度が異なり、それぞれの集団に分離して出現する。血球として、血小板 2 4、赤血球 2 5 が出現するが、いずれも前方散乱光強度と側方蛍光強度の違いから、担体粒子と弁別することができる。

【0021】

担体粒子を含むようにスキャッタグラム上でゲーティング（スキャッタグラム上の一定の領域を指定すること）を行って指定したゲーティングエリア G 1 内に出現している担体粒子の粒度分布の例を、図 3 のヒストグラムに示す。縦軸に粒子の個数（度数）を、横軸に前方散乱光強度をとっている。前方散乱光強度について閾値を設定することにより、凝集粒子と単独粒子を弁別する。

【0022】

弁別された単独粒子の粒子数 M と凝集粒子の粒子数 P（P は二個以上凝集している粒子数の合計）から、総粒子数 T を得て、凝集率 P/T を算出し、予め作成した検量線に基づき濃度換算することで、各免疫測定項目の抗原（抗体）濃度を得ることができる。

【0023】

血球は、前方散乱光強度と側方蛍光強度の違いから、その種類毎の集団となってスキャッタグラム上に出現する。そこで各種類の血球につき、出現すると目されるスキャッタグラム上の位置にゲーティングを行い、ゲーティングエリア内の粒子数を計数することで、血球の分類・計数を行う。図 2 中、ゲーティングエリア G 2 は血小板、G 3 は赤血球をそれぞれ弁別するためのゲーティングエリアである。

【0024】

担体粒子の粒子径や含有する蛍光色素の濃度、あるいは血球を染色する蛍光色素の濃度などを適宜調整し、スキャッタグラム上で担体粒子と血球の出現位置が異なるようにしてゲーティングエリアを設定すれば、血球と担体粒子を明確に弁別できる。また、免疫測定を複数項目にわたって行う場合には、第一の測定項目に対応する抗体又は抗原を感作した第一の担体粒子と、第二の測定項目に対応す

る抗体又は抗原を感作した第二の担体粒子を用意すればよい。このとき第一・第二それぞれの担体粒子が含有する蛍光色素の濃度を変えるなどすることで、第一の担体粒子と第二の担体粒子をスキャッタグラム上で弁別することができる。

【0025】

図4は、免疫測定を同時に2項目行なう場合のスキャッタグラムの例であり、ゲーティングエリアG1に出現する担体粒子（第一の担体粒子）より高濃度の蛍光色素を含有する第二の担体粒子が出現している。第二の担体粒子は、第一の担体粒子と同様に未凝集の単独粒子31、二個の担体粒子が凝集して生じた二個凝集粒子32、三個の担体粒子が凝集して生じた三個凝集粒子33というように、凝集の仕方によってそれぞれの集団に分離して出現している。そして第一の担体粒子を含むゲーティングエリアG1、第二の担体粒子を含むゲーティングエリアG4各々で、エリア内の粒度分布から凝集率を求め、第一・第二それぞれの項目の免疫測定を行うことができる。

【0026】

出力部14には、CRTやLCDといった表示装置やプリンタが用いられる。解析部13にて算出された免疫測定の結果や各種血球数、解析の際に作成されたスキャッタグラムやヒストグラムなどが出力部14に出力される。

【0027】

【実施例】

以下、血液と担体粒子を含む試料から前方散乱光強度と側方蛍光強度を検出し、それら光学的情報を解析することにより、血球計数測定と免疫測定（全血中のHBs抗原の検出）を同一の反応系・測定系から行う実験につき説明する。

【0028】

実験に用いる検体は、ヒト正常全血にHBs抗原を7段階の濃度別に添加したものを調製して検体①～⑦とした。検体①～⑦の各HBs抗原濃度は、①0 U/mL、②1 U/mL、③3 U/mL、④9 U/mL、⑤27 U/mL、⑥81 U/mL、⑦243 U/mL、である。

【0029】

測定には図1に示す本発明の血液分析装置を用いた。血液分析装置1は前述の

通り試料調製部 11、光検出部 12、解析部 13、出力部 14 からなる。試料調製部 11 は検体供給部 11a、ラテックス試薬供給部 11b、緩衝液供給部 11c、希釈液供給部 11d、染色液供給部 11e、第一反応槽 11f、第二反応槽 11g からなる。

【0030】

ラテックス試薬供給部 11b には以下の通り調製されたラテックス試薬がセットされる。ラテックス試薬とは、免疫測定対象物質と特異的に抗原抗体反応する抗体又は抗原（ここでは抗HBs抗体）を表面に感作したラテックス粒子を含む試薬であり、このラテックス粒子が担体粒子として作用する。

調製方法：担体粒子には粒子径 $0.78\mu\text{m}$ で粒子表面がスルフェートのラテックス粒子に赤色蛍光色素（波長 633nm のレーザ光で励起可能）を 1% (w/v) 含有させた蛍光ラテックス粒子を用いた。抗HBs抗体の感作は、まず抗HBs抗体（マウスモノクローナル抗体、市販品） $60\mu\text{g}$ を含むGTA緩衝液（ 0.53mg/mL 3,3-ジメチルグルタル酸、 0.4mg/mL トリス、 0.35mg/mL 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、 $\text{pH}4.6$ ） $950\mu\text{l}$ に、蛍光ラテックス粒子 10% (w/v) 懸濁液 $50\mu\text{l}$ を加え、 20°C で2時間静置した。これを $10000\times g$ 、10分間遠心し、上清を捨て、沈殿に 1% (w/v) 牛血清アルブミン（市販品）を含むGTA緩衝液を 1mL 加えて、超音波処理し、分散させた。この遠心から分散までの工程を数回繰り返し、最後に遠心して上清を捨て、沈殿に 220mg/mL グリセリン、 0.3% (w/v) 牛血清アルブミンを含むGTA緩衝液（ $\text{pH}6.2$ ） 1mL を加えて、超音波処理し、分散させた。これをラテックス試薬とした。

【0031】

緩衝液供給部 11c には以下の通り調製された反応緩衝液がセットされる。

調製方法： 1.6mg/mL 3,3-ジメチルグルタル酸、 1.1mg/mL 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、 18.18mg/mL トリス、 5% (w/v) 牛血清アルブミン、 0.8% (w/v) デキストラン（市販品）、 $\text{pH}6.70$ を調製し、検体へ添加して測定用試料とするための反応緩衝液とした。

【0032】

希釈液供給部 11d にはレットサーチ（II）希釈液（シスメックス株式会社製

）がセットされる。これは後述する染色液による血球の染色処理に際して試料を希釈するためのものである。染色液供給部 11e にはレットサーチ (II) 染色液（シスメックス株式会社製）がセットされる。レットサーチ (II) 染色液には、血球中の核酸を染色し波長633nmのレーザ光で励起可能なポリメチン系蛍光色素が含まれている。この色素により、血球中の核酸が蛍光染色される。

【0033】

検体を検体供給部 11a にセットすると、検体供給部 11a により検体20 μ L が定量され第一反応槽 11f へ送液される。次に緩衝液供給部 11c により反応緩衝液160 μ L が第一反応槽 11f へ送液され、検体と15秒間混和される。その後、ラテックス試薬供給部 11b によりラテックス試薬20 μ L が、第一反応槽 11f へ送液され、検体・反応緩衝液・ラテックス試薬が混和され、45℃で15分間インキュベーションされて、ラテックス試薬混合試料となる。この後、第一反応槽 11f から4.5 μ L 定量されたラテックス試薬混合試料と、希釈液供給部 11d によって定量されたレットサーチ (II) 希釈液0.8955mL がそれぞれ第二反応槽 11g に送液され、ラテックス試薬混合試料が希釈される。次に染色液供給部 11e によってレットサーチ (II) 染色液18 μ L が第二反応槽 11g に送液され、約31秒間染色反応を行い、測定用試料が調製される。

【0034】

このようにして調製された測定用試料2.8 μ L は光検出部 12 に送液され、試料中に含まれる各粒子から光学的情報として前方散乱光及び側方蛍光が得られる。図5に光検出部 12 の詳細な構成を示す。蛍光染色等の前処理が施された測定用試料をフローセル 41（図1の12a に対応）に流して試料流を形成する。そしてフローセル 41 中の試料流に対して半導体レーザ光源 42（図1の12b に対応）から照射されたレーザ光はコリメートレンズ 43 を介してフローセル 41 へ到達し、試料流を照射する。試料流中の粒子がレーザ光を横切る際に生じる前方散乱光は、集光レンズ 44a とピンホール 45a を介してフォトダイオード 46（図1の12d に対応）に入射する。側方蛍光は集光レンズ 44b とフィルタ 49 とピンホール 45b を介してフォトマルチプライヤチューブ 48（図1の12c に対応）に入射する。フォトダイオード 46 で光電変換されて出力される前方

散乱光信号、フォトマルチプライヤチューブ48で光電変換されて出力される側方蛍光信号は、解析部13へ送られる。

【0035】

解析部13では、光検出部12により検出した前方散乱光信号及び側方蛍光信号から粒子毎の前方散乱光強度及び側方蛍光強度を得て、それらをパラメータとしたスキヤッタグラムを作成する。図6は検体⑥を測定して得られたスキヤッタグラムであり、縦軸に前方散乱光強度、横軸に側方蛍光強度をとったものである。血小板・赤血球及び担体粒子は、前方散乱光強度及び側方蛍光強度の違いによりそれぞれの集団を形成している。図6のスキヤッタグラムにおいて、担体粒子が出現すると目される領域に予めゲーティングエリアG5が設定される。同様に、血小板が出現すると目される領域にゲーティングエリアG6が、赤血球が出現すると目される領域にゲーティングエリアG7が、それぞれ設定される。このゲーティングエリアの設定は、網状赤血球の出現を考慮し、ゲーティングエリアG7が成熟した赤血球の出現位置よりも蛍光強度の大きな位置を含むようにしてある。

【0036】

ゲーティングエリアG5内に担体粒子が単独粒子、二個凝集粒子、三個凝集粒子に分かれて出現していることがわかる。解析部13は、ゲーティングエリアG5内に出現した粒子の粒度分布を示すヒストグラムを作成する。図7は、ゲーティングエリアG5内に出現した粒子の粒度分布を示すヒストグラムであり、縦軸に度数（粒子数）を、横軸に前方散乱光強度をとったものである。解析部13は、ゲーティングエリアG5内の粒度分布に基づき、単独粒子数Mと凝集粒子数P（二個以上凝集している粒子数の合計）から総粒子数Tを得て、凝集率（ $P/T\%$ ）を求める。前記①～⑦の各検体を測定して得られた担体粒子の凝集率を表1に示す。

【0037】

【表1】

検体	凝集率 (P/T%)
①	0.37
②	0.78
③	1.80
④	4.91
⑤	13.46
⑥	29.68
⑦	45.31

【0038】

上記表1より、検体中に含まれる抗HBs抗体の濃度に依存して凝集率が変化していることがわかる。よって、既知濃度の免疫測定対象物質を含む検体を測定して予め作成した検量線に基づき、凝集率を濃度換算することで、検体中に含まれる免疫測定対象物質の濃度を得ることができる。

【0039】

図8は本血液分析装置において、検体として前記検体①と同じヒト正常全血を用い、前記試料調製部11での試料調製工程においてラテックス試薬を添加せずに測定用試料を調製したものを測定して得たスキヤッタグラムである。縦軸に前方散乱光強度、横軸に側方蛍光強度をとっている。測定用試料中にラテックス試薬が含まれていないので、図6と比べると図8のスキヤッタグラム上には担体粒子が現れないが、血小板・赤血球とも出現位置に変わりはない。すなわち、ラテックス試薬の有無は血球計数測定の結果に影響を与えないことがわかる。

【0040】

前述の通り図6のスキヤッタグラム上で、血小板・赤血球の各血球が出現すると目される領域に、ゲーティングエリアG6・G7を設定しておき、各エリア内に出現した粒子数が計数される。なお各種血球のうち白血球は、血小板や赤血球

よりも前方散乱光強度や蛍光強度が大きく、図6や図8に示したスキャッタグラムでは表示されない位置に出現してしまう。そこで、解析部13は、より大きな前方散乱光強度や側方蛍光強度を反映し、白血球と他の粒子との弁別が可能となるスキャッタグラムを作成し、他の血球と同様、出現すると目される領域にゲーティングエリアを設定してエリア内の粒子数を計数する。図9に白血球を分類計数するためのスキャッタグラムを示す。図6や図8と同様、縦軸に前方散乱光強度、横軸に側方蛍光強度をとったものであるが、各パラメータの表示範囲をより大きくとっていることにより白血球の出現が明確となる。その代わりに、図6や図8のスキャッタグラムでは明確に分かれて出現していた血小板、赤血球、担体粒子の各集団は、図9のスキャッタグラム上では左下方部に固まって出現し、明確に分かれて表示されない。ゲーティングエリアG8は、白血球が出現すると目される領域に設定されたゲーティングエリアであり、この領域内に出現した粒子が白血球として計数の対象となる。

【0041】

解析部13は、スキャッタグラム上のゲーティングエリアG6・G7・G8内に出現した粒子をそれぞれ計数し、血小板数・赤血球数・白血球数とする。また赤血球として計数された各粒子の容積を前方散乱光強度に基づいて算出してそれらを合計する。そして合計した値を粒子数で除算することによりMCV（平均赤血球容積）を算出する。

【0042】

本発明の分析装置により検体⑥を測定し、図6及び図9に示すスキャッタグラムのゲーティングに基づき各種血球の分類計数を行った結果と、検体⑥と同じ全血検体を従来法によって測定した結果を比較した。従来法は、全血検体のセットから解析に至る測定の全工程を自動血球分析装置XE-2100（シスメックス株式会社製）の通常の測定方法に従って行ったものである。XE-2100は、光学式の検出系以外にいわゆる電気抵抗式の検出器を有しており、血小板数、赤血球数、MCV（平均赤血球容積）は、電気抵抗式の検出器により検出された結果に基づき算出される。白血球数は、光学式の検出系により検出された結果に基づき算出される。

【0043】

【表 2】

	本発明	従来法
赤血球	4.70 (10^6 個/ μ L)	4.60 (10^6 個/ μ L)
血小板	301 (10^3 個/ μ L)	302 (10^3 個/ μ L)
白血球	12.10 (10^3 個/ μ L)	12.17 (10^3 個/ μ L)
MCV	95.8 (fL)	95.8 (fL)

【0044】

赤血球・血小板・白血球及びMCVの各血球計数項目につき検体⑥を本発明の方法により測定した結果と、従来法にて測定した結果を上記表2に示す。本発明による血球計数結果は従来法との間で良い相関が得られている。

【0045】

ヘマトクリット補正

免疫測定において、免疫測定対象物質の抗原や抗体が血清・血漿中にのみ存在する場合は、全血中に占める血球成分の容積比率（ヘマトクリット値）の違いにより、全血で免疫測定を行った場合と血清（又は血漿）に対する測定を行った場合とで、含まれる免疫測定対象物質の濃度に違いが生じる。ヘマトクリット値には個体差があるので、全血免疫測定の結果に一定の係数をかける方法では、血清や血漿を用いて測定した場合の測定値に正確に補正することは困難である。そこで、全血免疫測定の結果を、血球計数測定から得られたヘマトクリット値を用いて血清や血漿を用いて測定した場合の測定値に補正する、いわゆるヘマトクリット補正を用いれば、血清（又は血漿）に対して行った測定と同様の測定値が得られる。

【0046】

ヘマトクリット値は全血中に占める血球成分の容積比率であるが、血球成分の大部分を占める赤血球容積比率をヘマトクリット値として用いる例を以下に述べる。本分析装置では前記の通り、赤血球として計数された各粒子の容積を前方散乱光信号に基づき算出する。そして各粒子の容積を合計し、粒子数で除算するこ

とによりMCVを算出している。解析部13ではさらにこのMCVに粒子数を乗ずることによりヘマトクリット値を算出する。ここで全血中の免疫測定対象物質の濃度をA、血清（又は血漿）中の免疫測定対象物質の濃度をB、ヘマトクリット値（%）をCとすると、血清（又は血漿）中の免疫測定対象物質の濃度Bは以下の式

$$B = A \times 100 / (100 - C)$$

によって求められる。解析部13ではこの式を用い、全血に対する免疫測定の結果に対して血球計数測定で求めたヘマトクリット値を用いた補正を行うことにより、全血中における免疫測定対象物質の濃度が血清（又は血漿）中における免疫測定対象物質の濃度に換算される。

【0047】

解析部13にて算出された免疫測定の結果やヘマトクリット補正の結果、各種血球数、解析の際に作成されたスキャッタグラム、ヒストグラムは出力部14に出力される。

【0048】

なお、上記に示してきた実施例の血球計数測定及び免疫測定では、光学的情報として前方散乱光と側方蛍光を用いた。しかし光学的情報はそれらに必ずしも限られることはなく、側方散乱光、吸光度、燐光、化学発光、生物発光など各種光学的情報のうち、血球及び担体粒子から共通して得られるものを適宜選択すればよい。また用いる光学的情報に応じ、担体粒子には各種色素、発光基質等が適宜含有されるようにしておくことができる。

【0049】

【発明の効果】

本発明により、血球計数測定と免疫測定を同一の反応系・測定系から行うことが可能となる。これにより、複数の測定項目にわたり検体・試薬の共通化を図ることができ、また分析装置において検出部を共通化することができる。また免疫測定において検体の遠心分離を要さない全血測定を可能とし、検体採取から検査結果を得るまでの時間を短縮できる。免疫測定の結果に対して行うヘマトクリット補正を、同一の反応系における血液試料から得られた血球計数測定に基づき行

うことができるので、より正確なヘマトクリット補正ができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本実施例の血液分析装置の構成を説明する模式図である。

【図 2】

スキヤッタグラム上で担体粒子と血球とが異なる位置に出現した様子を説明する図である。

【図 3】

スキヤッタグラムにおける担体粒子のゲーティングエリア内に出現した粒子のヒストグラムを説明する図である。

【図 4】

スキヤッタグラム上で異なる位置に出現した第一の担体粒子と第二の担体粒子とをそれぞれゲーティングした様子を説明する図である。

【図 5】

本実施例の血球分析装置の光検出部を説明する図である。

【図 6】

本実施例で得られたスキヤッタグラムの一例を示す図である。

【図 7】

本実施例で得られたスキヤッタグラム上の、担体粒子のゲーティングエリア内に出現した粒子の粒度分布を表わすヒストグラムを示す図である。

【図 8】

本実施例で得られたスキヤッタグラムの一例を示す図である。

【図 9】

本実施例で得られたスキヤッタグラムの一例を示す図である。

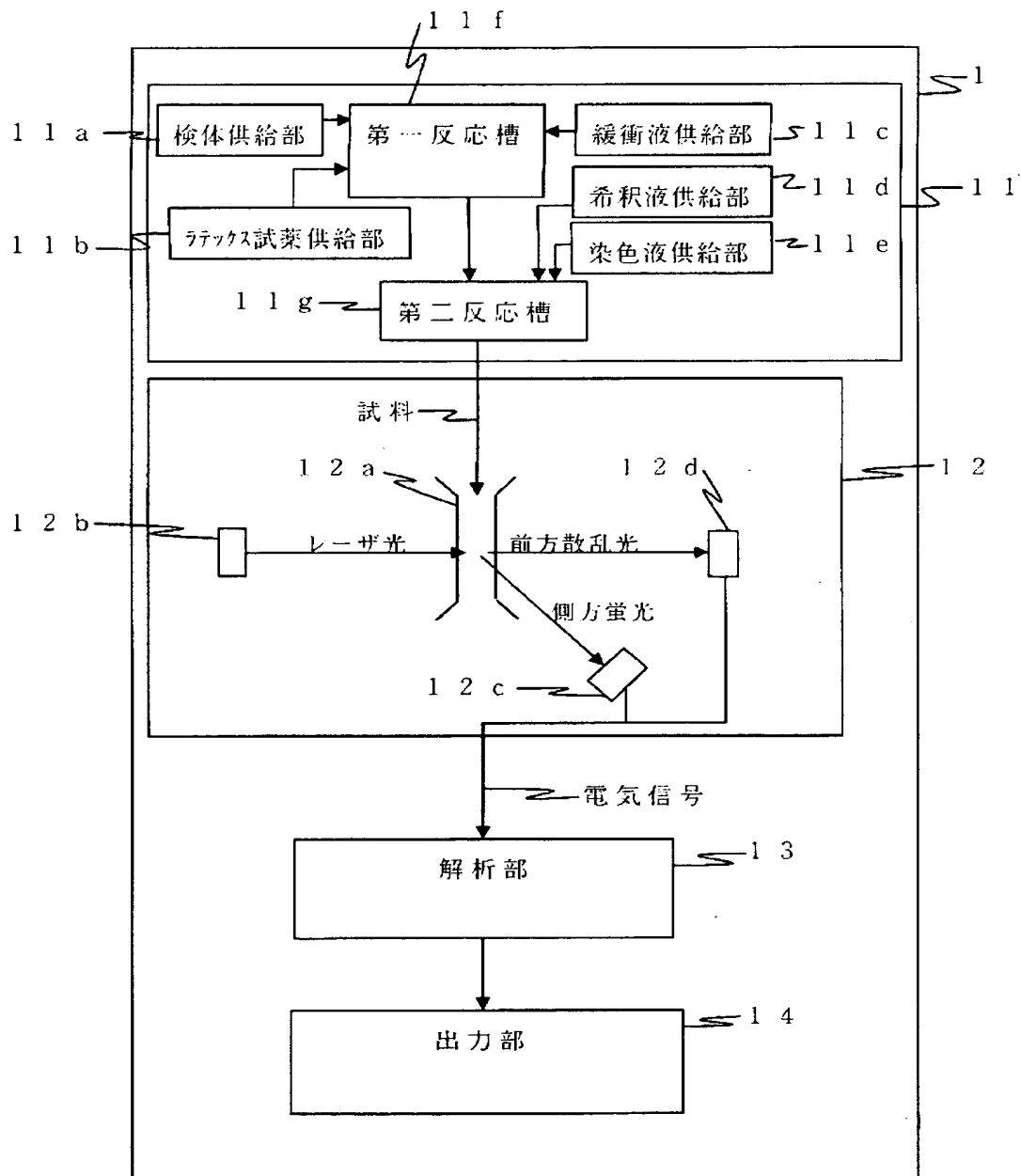
【符号の説明】

- 1 血液分析装置
- 1 1 試料調製部
- 1 2 光検出部
- 1 3 解析部

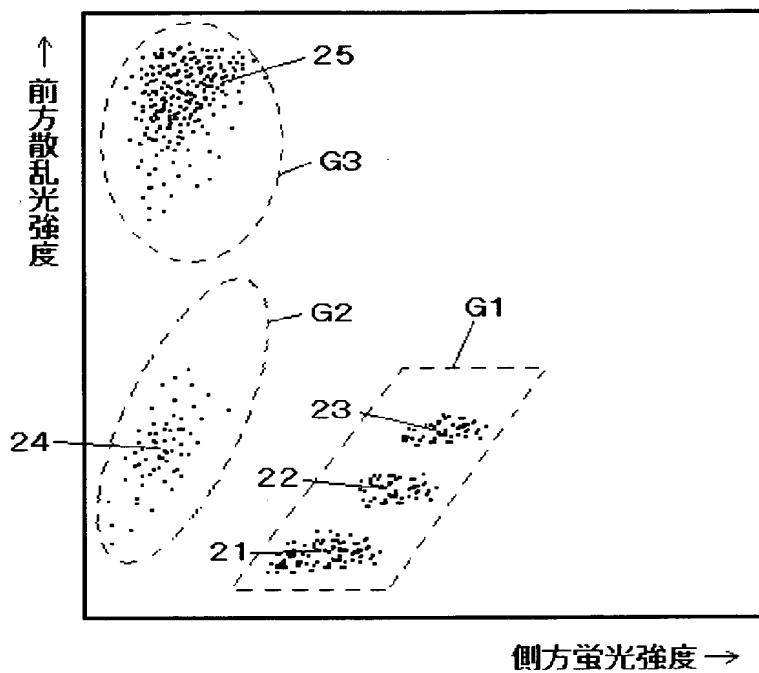
- 1 4 出力部
- 2 1 担体粒子の単独粒子
- 2 2 担体粒子の二個凝集粒子
- 2 3 担体粒子の三個凝集粒子
- 2 4 血小板
- 2 5 赤血球
- G 1 ゲーティングエリア
- G 2 ゲーティングエリア
- G 3 ゲーティングエリア

【書類名】 図面

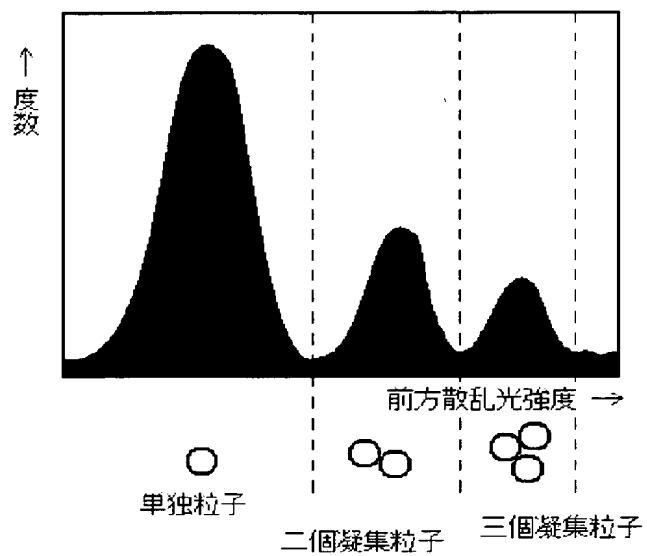
【図1】



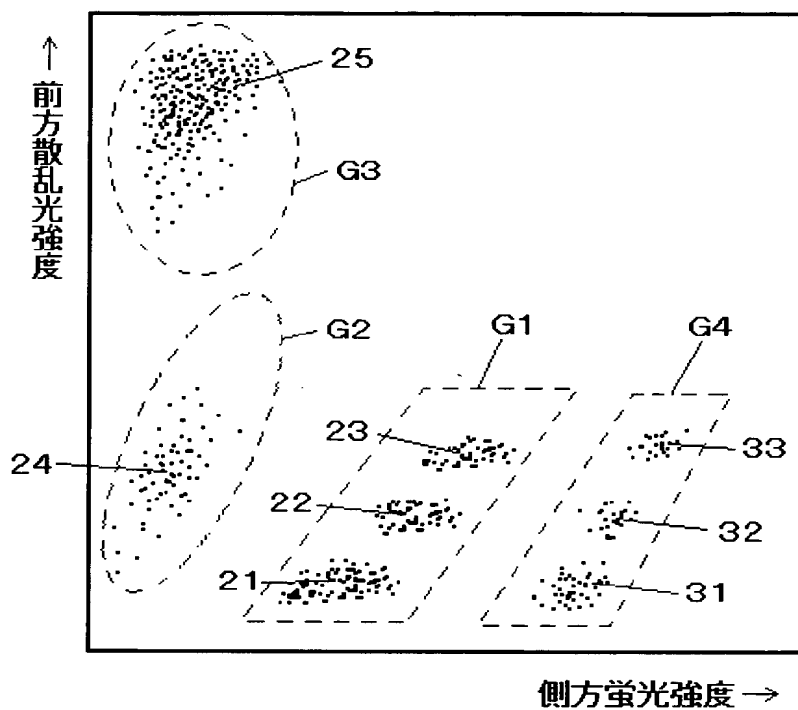
【図 2】



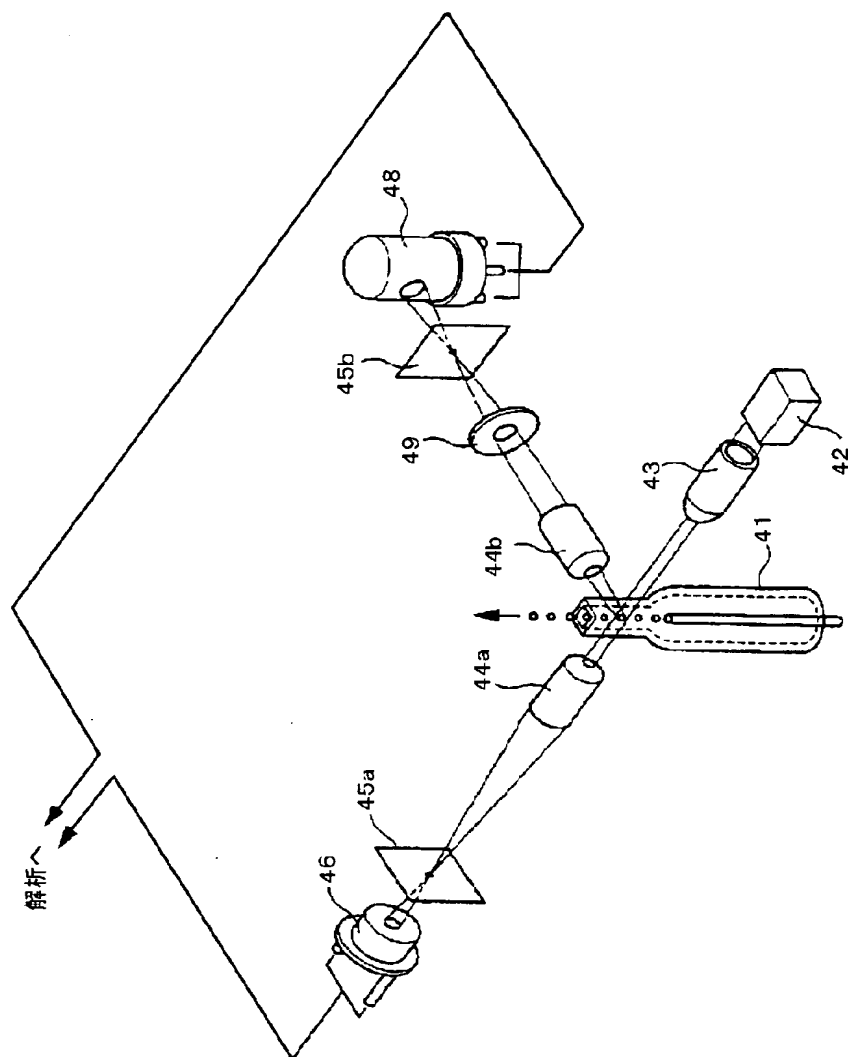
【図 3】



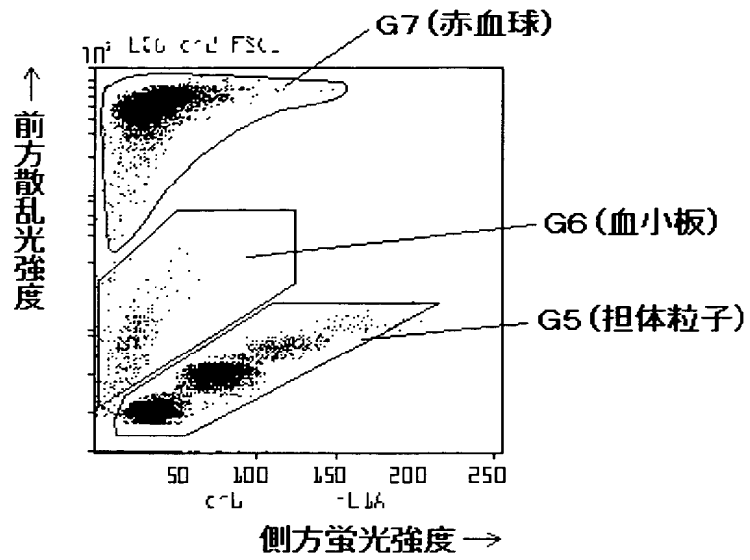
【図 4】



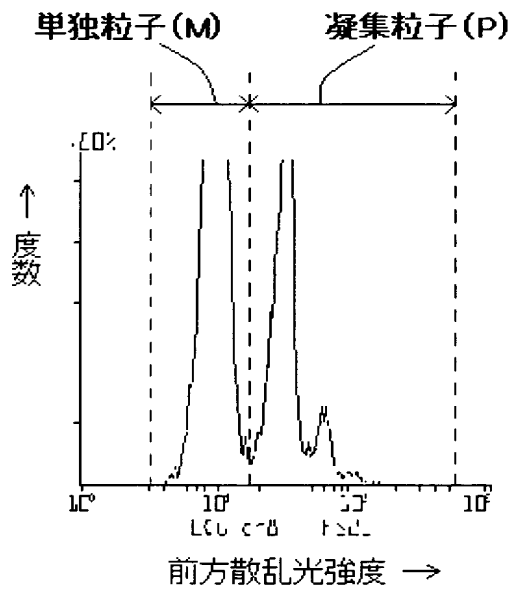
【図 5】



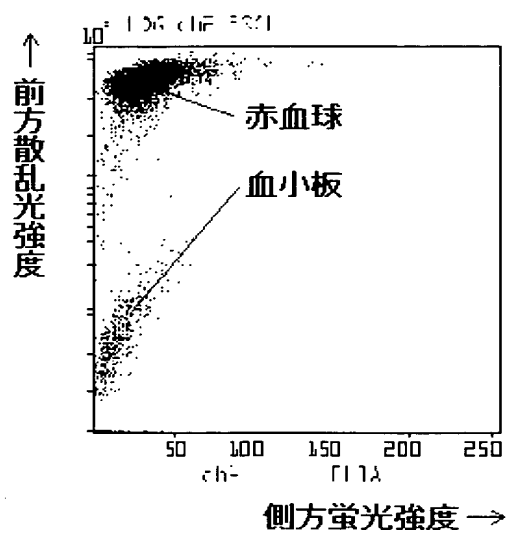
【図 6】



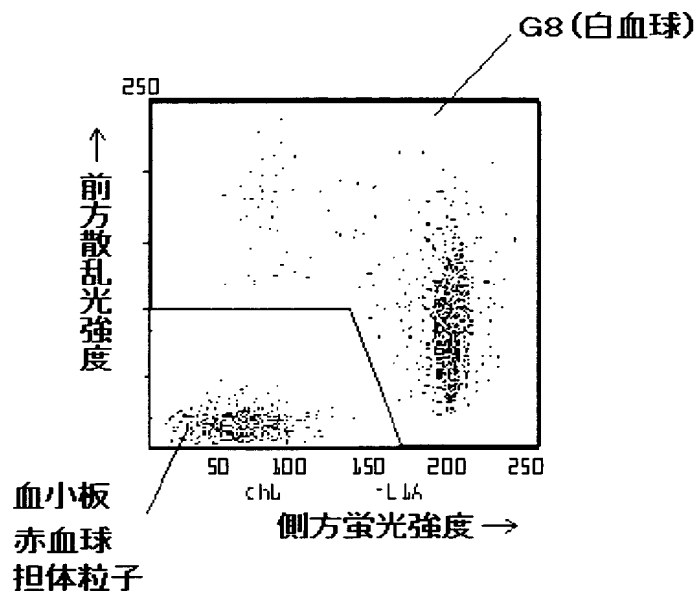
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 全血を検体とし、一つの反応系・測定系で血球計数測定と免疫測定を可能にする。

【解決手段】 本発明では、全血検体を免疫測定対象物質に対する抗体又は抗原が感作された担体粒子と混和して調製した試料から、2以上の光学的情報を検出し、担体粒子の凝集度に基づく免疫測定と、血球計数測定とを、一つの反応系・測定系から同時に行う。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 1 9 1 8 7
受付番号	5 0 2 0 1 1 1 1 1 3 5
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 4 年 7 月 3 0 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年 7月29日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 1 9 1 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 1 4 9 6 0]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 8 年 1 0 月 7 日

名称変更

住所変更

住 所
氏 名

神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
シスメックス株式会社